

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° d publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 689 640

(21) N° d'enregistrement national :

92 04184

(51) Int Cl<sup>s</sup> : G 01 N 33/52

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 06.04.92.

(71) Demandeur(s) : Société Anonyme dite: BIO  
MERIEUX — FR.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 08.10.93 Bulletin 93/40.

(72) Inventeur(s) : Pittet Jean-Louis René et Aiach Martine  
Geneviève Henriette.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

(74) Mandataire : Cabinet Nony & Cie.

(54) Procédé pour la détermination d'une activité protéine C et/ou protéine S dans un échantillon plasmatique .

(57) Procédé pour la détermination d'une activité protéine  
C et/ou protéine S dans un échantillon plasmatique com-  
prenant les étapes consistant à:

- a) préparer un mélange comprenant:
  - i) l'échantillon plasmatique;
  - ii) une quantité prédéterminée de thrombomoduline;
  - iii) au moins un facteur activé de la coagulation et/ou au moins un activateur des facteurs de la coagulation pour permettre la formation de thrombine endogène;
- b) incuber le mélange ainsi obtenu dans des conditions permettant l'activation de la protéine C et l'expression de la protéine C activée;
  - c) ajouter au mélange un substrat de la thrombine; et
  - d) quantifier l'activité protéine C et /ou protéine S dans l'échantillon par détermination d'une activité enzymatique de la thrombine sur ledit substrat.

Ce procédé, qui permet d'éviter le recours à un activateur exogène, présente l'avantage d'être simple, facilement automatisable et sensible, même à des faibles concentrations en protéine C et/ou S.

FR 2 689 640 - A1



La présente invention a pour objet un procédé pour la détermination d'une activité protéine C et/ou protéine S, particulièrement dans le plasma.

5       La protéine C est une glycoprotéine plasmatique à double chaîne, vitamine K dépendante, produite dans le foie. Les cellules hépatiques synthétisent un précurseur de la protéine C dépourvu d'activité anticoagulante. Ce précurseur est un polypeptide de 461 acides aminés, qui comporte à son extrémité N terminale une séquence de tête ou séquence "leader" de 42 acides aminés permettant le transport et la maturation 10 intracellulaire de la protéine C. Les deux tiers de l'extrémité N terminale de cette séquence correspondent à une séquence signal nécessaire pour la translocation de la chaîne polypeptidique à travers la membrane du réticulum endoplasmique. Le tiers C-terminal de la séquence "leader" correspond à un propeptide essentiel à la reconnaissance du 15 polypeptide précurseur par une carboxylase vitamine K dépendante. Cette enzyme assure la carboxylation de 9 acides glutamiques situés dans la partie N terminale de la protéine C mature. Sous l'action d'une endopeptidase, le propeptide est éliminé, un dipeptide interne est éliminé et la protéine C est excrétée dans le sang circulant, sous forme 20 bicateinaire. La protéine C elle-même est une proenzyme inactive qui développe une activité sérine protéase après clivage de l'extrémité N terminale de la chaîne lourde par le complexe thrombine-thrombomoduline. La protéine C ainsi activée agit comme anticoagulant par inactivation des 25 facteurs V et VIII activés de la coagulation. L'action anticoagulante de la protéine C activée requiert la présence d'un cofacteur, la protéine S. Physiologiquement, la protéine C et la protéine S forment un complexe équimolaire à la surface des plaquettes ou des cellules endothéliales en présence d'ions calcium.

30       La protéine S est une glycoprotéine vitamine K dépendante, à chaîne unique, notamment synthétisée dans le foie dans les mêmes conditions que la protéine C. La protéine S existe dans le plasma sous deux formes, une forme libre et une forme liée à une protéine du système du complément ("C4b binding protein": C4b BP). Seule la forme libre de la protéine S est active pour stimuler la protéine C activée.

Des déficits acquis en protéine C ou en protéine S sont observés chez des patients présentant des atteintes hépatiques ou soumis à un traitement par des anti-vitamine K. Ces déficits acquis se manifestent par un taux plasmatique de protéine C ou protéine S inférieur aux valeurs normales de ces deux protéines chez les sujets sains. Par ailleurs, les travaux de Griffin et al. (Deficiency of Protein C in congenital thrombotic diseases, Journal of Clinical Investigation 68 : 1370-1373 (1981)) ont permis de mettre en évidence une relation entre le développement de thrombose veineuse chez des sujets apparemment sains et un déficit constitutionnel héréditaire en protéine C.

Actuellement, on distingue deux types de déficit héréditaire en protéine C ou S. Les déficits de type I se caractérisent par une diminution de la concentration plasmatique de protéine C et/ou S par rapport aux valeurs normales et en conséquence par une diminution de l'activité de ces protéines. Il s'agit donc de déficits quantitatifs, qui reflètent une anomalie de l'un des gènes codant pour la protéine empêchant la traduction du polypeptide précurseur de la protéine C ou de la protéine S. Ces déficits constitutionnels en protéine C et/ou S sont classiquement associés à des accidents thromboemboliques veineux, voire artériels.

Dans les déficits en protéine C et/ou S de type II, la protéine est présente en quantité normale dans le plasma, mais son activité fonctionnelle est réduite. Ce type de déficit reflète la synthèse d'une protéine anormale, résultant d'au moins une mutation ponctuelle du gène. Ces déficits sont dus à la substitution d'au moins un acide aminé par un autre et peuvent affecter tous les domaines fonctionnels de la protéine C ou S. Tout comme pour les déficits de type I, ces déficits qualitatifs s'accompagnent de risques importants de thrombose veineuse.

Il est donc indispensable de disposer d'un test fiable qui permette la détection de tous les déficits quantitatifs et/ou qualitatifs en protéine C et/ou S et qui de plus soit simple à mettre en oeuvre et facilement automatisable, un tel test n'existant pas à ce jour.

Il existe des tests disponibles commercialement, dans lesquels la quantité de protéine C dans le plasma est déterminée par réaction immunologique avec des anticorps. L'inconvénient majeur de tels tests est qu'ils ne permettent pas de déceler les déficits de type II, les anticorps reconnaissant indifféremment la protéine normale et anormale.

D'autres procédés ont été développés, qui consistent à convertir la protéine C inactive en protéine C activée et à déterminer son activité enzymatique, soit sur un substrat de synthèse (activité amidolytique), soit sur ses substrats naturels, les facteurs V et VIII activés, retardant 5 la formation de thrombine (activité anticoagulante).

L'activité amidolytique de la Protéine C est déterminée par une méthode photométrique à l'aide d'un substrat chromogène de synthèse de la Protéine C et détermination de l'activité enzymatique de la Protéine C activée sur ce substrat par une mesure d'absorption à 405 nm de la partie 10 chromophore libérée du substrat.

L'activité anticoagulante de la Protéine C est déterminée soit par une méthode photométrique à l'aide d'un substrat chromogène de synthèse de la thrombine et détermination de l'activité enzymatique (activité amidolytique) de la thrombine sur ce substrat, soit par une méthode 15 chronométrique qui consiste à déterminer le temps de formation d'un caillot plasmatique par activité enzymatique (activité coagulante) de la thrombine sur son substrat naturel, le fibrinogène. Dans ce dernier cas, la méthode chronométrique est par exemple la détermination d'un temps de céphaline plus activateur.

20 R. B. FRANCIS et M.J. PATCH (Thrombosis Research, 32, 605-613 (1983)) ont décrit un procédé de détermination de l'activité anticoagulante de la protéine C activée dans le plasma humain. Dans ce procédé, la protéine C est au préalable extraite par adsorption du plasma par le citrate de baryum pour s'affranchir de l'effet de ses inhibiteurs, 25 puis activée par addition de thrombine exogène. L'activité de la thrombine est ensuite inhibée par l'addition d'antithrombine III (AT III) et d'héparine, puis l'héparine est neutralisée par une quantité précise de sulfate de protamine qui doit être déterminée exactement pour chaque essai. L'activité de la protéine C est ensuite mise en évidence par l'allongement du temps de céphaline plus activateur, l'indicateur de la 30 réaction étant, dans ce cas, la transformation de fibrinogène en fibrine sous l'action de la thrombine et la formation du caillot plasmatique. Ce procédé présente cependant plusieurs inconvénients majeurs. Tout d'abord, l'étape nécessaire d'extraction de la protéine C n'est pas automatisable. 35 De plus, au cours de l'extraction, l'adsorption de la Protéine C et l'élation de la protéine C adsorbée peuvent être incomplètes et variables,

ce qui se traduit par une récupération hétérogène rendant le procédé difficilement reproductible. Enfin, ce procédé nécessite une étape d'inactivation de l'excès de thrombine exogène pour éviter toute interférence avec l'activité de la thrombine formée au cours du procédé de détermination. L'AT III doit donc être ajoutée à une concentration très précisément déterminée et l'excès d'héparine doit lui aussi être neutralisé.

R.M. BERTINA et al. (Thrombosis Haemostasis, 51, 1-5 (1984)) ont décris un procédé spectrophotométrique pour la détermination de l'activité amidolytique de la protéine C. Ce procédé consiste à extraire la protéine C par une adsorption par l'hydroxyde d'aluminium; à activer la protéine C ainsi extraite du plasma par l'addition de thrombine; à neutraliser l'activité de la thrombine par de l'AT III et de l'héparine; et à mesurer l'activité amidolytique de la protéine C activée avec un substrat synthétique chromogène de la protéine C. Ce test étant sensible à la présence de très petites concentrations d'héparine dans le plasma, il est nécessaire lors de la détermination de l'activité de la protéine C dans des plasmas de patients ayant subi un traitement à l'héparine d'ajouter du chlorure de protamine au plasma avant l'étape d'adsorption par l'hydroxyde d'aluminium.

Ce procédé, tout comme celui de FRANCIS et al., présente l'inconvénient de nécessiter une étape d'extraction de la protéine C et une étape de neutralisation de la thrombine exogène par addition d'un inhibiteur dans des conditions très précisément déterminées, comme expliqué précédemment. Par ailleurs, l'utilisation d'un substrat synthétique pour doser l'activité amidolytique de la protéine C ne permet pas de détecter tous les déficits de type II de la protéine. En effet, certaines anomalies peuvent se traduire par une perturbation de la reconnaissance, par la Protéine C, de ses substrats protéiques (facteurs V et VIII activés) ou de sa liaison avec la Protéine S. Dans ce cas, l'activité enzymatique de la Protéine C activée vis à vis de substrats de synthèse est conservée, ce qui conduit à une activité amidolytique normale et à une interprétation erronée des résultats.

Une amélioration au procédé de BERTINA et al. a été proposée, telle que décrite dans la demande de brevet austalien n° 569433 déposée au nom de la société BOEHRINGER MANNHEIM. Ce procédé consiste à extraire la protéine C du plasma par adsorption par le citrate de baryum ou par

1'hydroxyde d'aluminium ; à activer la protéine C ainsi séparée par addition de thrombine ; à neutraliser la thrombine ajoutée par addition d'AT III en excès; et à déterminer l'activité anticoagulante de la protéine C activée en mesurant l'activité amidolytique de la thrombine à l'aide d'un substrat de synthèse chromogène. Ce procédé résulte de la démonstration qu'un excès d'AT III ne fausse pas les résultats de la réaction, de sorte qu'il n'est plus nécessaire de mesurer très exactement la quantité d'inhibiteur ajouté. Cependant, ce procédé nécessite une étape d'extraction de la protéine C qui présente les inconvénients décrits 10 précédemment.

Selon d'autres méthodes de détermination de l'activité de la Protéine C, on utilise comme activateur de la protéine C une protéase extraite de venin de serpent commercialisée sous la dénomination Protac (marque enregistrée, PENTAPHARM) (J.L. MARTINOLI et al.; Thromb. Res. 43 ; 15 253-264, 1986). La détermination de l'activité de la protéine C est effectuée soit à l'aide d'un substrat de synthèse chromogène de la protéine C par la méthode photométrique qui mesure l'activité amidolytique de la Protéine C activée, soit par son action sur les substrats naturels (facteurs V et VIII activés) apportés par un plasma exempt de protéine C 20 25 par la détermination d'un temps de céphaline plus activateur qui mesure l'activité anticoagulante de la Protéine C activée. L'un des inconvénients majeurs dans l'utilisation d'un activateur non physiologique, tel que le Protac, est qu'il ne permet pas de mettre en évidence des déficits au niveau de certains domaines fonctionnels de la protéine participant à son activation par la thrombine et/ou par le complexe thrombine-thrombomoduline. De plus, on ne sait pas avec exactitude, selon 30 35 les connaissances actuelles, si le Protac ou autre venin de serpent active sélectivement la protéine C carboxylée ou s'il active indifféremment la protéine C carboxylée et ses formes partiellement ou totalement non carboxylées, de sorte que dans le cas d'une méthode photométrique par mesure de l'activité amidolytique de la Protéine C activée, on peut obtenir des résultats apparemment normaux, bien qu'il existe une anomalie au niveau des sites de carboxylation de la protéine C.

La quantité de protéine S dans le plasma peut être déterminée par 35 exemple par un test immunologique, tel que décrit par BERTINA et al. (Thrombosis Haemostasis, 53, 268-272 (1985)). Cependant, ce procédé présente l'inconvénient majeur de ne pas être spécifique de la protéine

fonctionnelle. En d'autres termes, les anticorps utilisés réagissent indifféremment avec une protéine S normale ou anormale, et avec la protéine S liée à la C4b BP qui est inactive. Ce type de système n'est pas satisfaisant car il ne permet en aucun cas de dépister un déficit qualitatif de la protéine S dû à une substitution d'au moins un acide aminé par un autre dans un domaine fonctionnel de cette protéine. Dans cet article, les auteurs décrivent également un procédé de détermination de la protéine S fonctionnelle selon lequel on ajoute de la protéine C activée au plasma humain et on détermine ensuite le temps de céphaline plus activateur du mélange, sachant que plus ce temps est allongé, plus grande est la concentration de protéine S fonctionnelle. Cependant, ce procédé présente le désavantage de ne pas permettre une détermination simultanée du système protéine C - protéine S dans le plasma.

Le brevet américain 5.001.069 décrit un procédé photométrique de détermination d'une activité anticoagulante protéine C et/ou protéine S dans un échantillon plasmatique, qui consiste à incuber simultanément l'échantillon avec un venin de serpent pour activer la protéine C, un substrat synthétique chromogène de la thrombine et un activateur du système de coagulation et à mesurer l'activité amidolytique de la thrombine sur le substrat de synthèse comme indicateur de l'activité protéine C et/ou protéine S dans l'échantillon. L'intérêt principal de ce procédé réside dans l'utilisation de venin de serpent comme activateur, parce que contrairement à d'autres activateurs de la protéine C tels que la thrombine, il n'a pas d'action sur le substrat de la thrombine et il n'est donc pas nécessaire de procéder à sa neutralisation. Cependant, comme expliqué précédemment, l'utilisation de venin de serpent, tel que le Protac, ne permet pas de mettre en évidence toutes les anomalies des domaines fonctionnels de la protéine C et/ou protéine S.

C'est donc l'objet de la présente invention que de fournir un nouveau procédé pour la détermination d'une activité anticoagulante protéine C et/ou protéine S dans un échantillon plasmatique qui pallie les inconvénients des procédés antérieurs connus et qui de plus soit simple à mettre en oeuvre et facilement automatisable, notamment dans le cas d'une utilisation en routine dans des laboratoires d'analyses.

La présente invention procède de la découverte surprenante qu'il est possible d'activer le système protéine C et/ou protéine S sans avoir

recours à un activateur exogène qui, comme décrit précédemment, présente de nombreux inconvénients. De plus, le procédé de la présente invention présente les avantages d'être simple, facilement automatisable et sensible, même à des concentrations relativement faibles en protéine C et/ou S.

Aussi, le procédé de la présente invention pour la détermination d'une activité anticoagulante protéine C et/ou S dans un échantillon plasmatique comprend les étapes consistant à :

a - préparer un mélange comprenant :

10 i) l'échantillon plasmatique ;

ii) une quantité prédéterminée de thrombomoduline pour permettre l'activation de la protéine C ;

15 iii) au moins un facteur activé de la coagulation et/ou au moins un activateur de facteurs de la coagulation pour permettre la formation de thrombine endogène ;

b - incuber le mélange ainsi obtenu dans des conditions permettant l'activation de la Protéine C et l'expression de la protéine C activée ;

c - ajouter au mélange un substrat de la thrombine ; et

20 d - quantifier l'activité protéine C et/ou protéine S dans l'échantillon par détermination d'une activité enzymatique de la thrombine sur ledit substrat.

Bien entendu, il est connu de l'homme du métier que le mélange doit contenir une concentration prédéterminée en ions  $Ca^{++}$  pour activer la formation de thrombine endogène et l'expression de la protéine C activée. Ces ions  $Ca^{++}$  peuvent être apportés au mélange par exemple par l'addition de thrombomoduline en solution dans un tampon calcique et/ou par les facteurs et activateurs des facteurs de coagulation et/ou par addition séparée. Dans le procédé selon l'invention, les ions  $Ca^{++}$  peuvent être apportés au mélange par les activateurs des facteurs de la coagulation.

30 Par ailleurs, les conditions d'incubation du mélange doivent être déterminées pour permettre l'activation de la protéine C par le complexe thrombomoduline exogène-thrombine endogène et l'expression de l'activité anticoagulante de la protéine C activée conduisant à l'inhibition de la formation de thrombine endogène. Ces conditions (temps, température) peuvent être déterminées dans chaque cas par des expériences de routine.

Aussi, selon un mode de réalisation particulier de l'invention, l'incubation du mélange est effectuée pendant 3 à 6 minutes, avantageusement 5 minutes, à 37°C.

La thrombomoduline peut être d'origine humaine et/ou animale, native et/ou recombinante, modifiée et/ou non modifiée.

La thrombomoduline native humaine ou animale, par exemple de lapin, est extraite des cellules, par exemple les cellules endothéliales de poumon, de placenta, d'aorte, de pancréas, de foie, de rein, de peau, de cœur ou analogues. L'extraction peut être effectuée par un traitement des cellules endothéliales, par exemple par traitement thermique ou traitement chimique par un tensioactif ou un mélange de tensioactifs, selon les techniques conventionnelles, de façon à obtenir de la thrombomoduline soluble en présence de son environnement phospholipidique qui favorise sa solubilisation dans le mélange de l'invention. L'extraction peut également être effectuée après une étape préalable de traitement des tissus, tel qu'un traitement chimique, pour enlever l'environnement phospholipidique et la thrombomoduline insoluble ainsi obtenue est ensuite résolubilisée par addition subséquente d'agents chimiques de solubilisation, tel qu'un tensioactif ou un mélange de tensioactifs, par exemple un tensio-actif anionique tel que du désoxycholate de sodium ou un tensio-actif non ionique tel que du Triton X100 (nom commercial) ou par addition de phospholipides en milieu aqueux, tels que des phospholipides humains, animaux, végétaux ou de synthèse, ou encore par traitement enzymatique avec une élastase. Un traitement enzymatique par l'élastase permet à la fois de solubiliser la thrombomoduline et de supprimer son activité stimulant l'AT III. Il a en effet été montré que le domaine de la thrombomoduline adjacent à la partie transmembranaire, qui lui confère son insolubilité, est riche en chaînes polysaccharidiques susceptibles de multiplier par 4 ou 5 l'inhibition de la thrombine par l'AT III présente dans le plasma. Ces chaînes polysaccharidiques peuvent ainsi modifier la quantité de thrombine formée et fausser les tests. Pour les éliminer il est possible soit de cliver la partie C terminale de la thrombomoduline par l'élastase qui sépare le domaine porteur des sites de glycosylation et en même temps rend la molécule soluble, sans altérer ses sites de fixation pour la thrombine, soit de cliver les chaînes polysaccharidiques par un traitement enzymatique approprié, par exemple par la chondroïtinase, trypsine ou analogues, qui ne modifie pas la fixation de la thrombine,

donc l'activation de la protéine C, tout en éliminant l'effet sur la neutralisation par l'AT III. Les chaînes polysaccharidiques peuvent aussi être neutralisées par addition de polycations, tels que bromure d'hexadiméthrine (Polybrène, marque déposée, ABBOTT LABORATORIES), sulfate de protamine, poly L-lysine ou analogues.

La thrombomoduline peut également être obtenue par recombinaison génétique. Un gène d'origine humaine ou animale codant pour la thrombomoduline, peut ainsi être cloné dans un vecteur d'expression et introduit dans une cellule procaryote ou eucaryote. La thrombomoduline peut être exprimée sous forme insoluble si l'ADNc code pour la synthèse complète de la protéine et solubilisée comme décrit précédemment, ou directement sous forme soluble si la transfection ne concerne que la partie de l'ADNc codant pour la partie soluble de la protéine. La thrombomoduline ainsi obtenue peut de plus être modifiée par un traitement enzymatique ou chimique approprié comme décrit précédemment.

La formation de thrombine selon le procédé de l'invention est déclenchée par l'addition au mélange de facteurs de coagulation activés, tels que les facteurs XII et/ou X activés, et/ou d'activateurs des facteurs de la coagulation.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la formation de thrombine est déclenchée par addition au mélange d'un activateur du facteur XII en présence d'un mélange de phospholipides, ledit activateur étant choisi parmi l'acide ellagique, le kaolin, la silice ou la silice diatomée telle que la Céline ( nom commercial ). Selon un autre mode de réalisation, la formation de thrombine est déclenchée par addition au mélange d'un activateur du facteur VII, par exemple de la thromboplastine humaine ou animale, native ou recombinante, ou leurs mélanges. Selon un troisième mode de réalisation, un activateur du facteur X, par exemple du venin de serpent, tel que du venin de Vipera Russellii en présence de phospholipides, est ajouté au mélange de l'invention.

Le mélange de phospholipides est soit d'origine animale, soit d'origine végétale, soit de synthèse.

La concentration des facteurs de coagulation et/ou des activateurs des facteurs de la coagulation influence le temps de formation de la thrombine endogène. Aussi, les concentrations sont déterminées de façon à

favoriser l'activation de la protéine C par la thrombine, et l'expression anticoagulante de la protéine C activée.

La quantification de l'activité du système Protéine C et/ou Protéine S est effectuée selon des méthodes conventionnelles. Selon un mode de réalisation de l'invention, la formation endogène de thrombine est déterminée par addition au mélange préalablement formé du substrat naturel de la thrombine, c'est-à-dire le fibrinogène, et détermination de l'activité coagulante de la thrombine par une méthode chronométrique. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, l'activité du système Protéine C et/ou Protéine S est déterminée selon les méthodes dites photométriques. Par détermination photométrique selon l'invention, il faut comprendre la mesure d'une quantité de lumière émise ou absorbée par le substrat. Ce peut être par exemple, la détermination d'une activité colorimétrique, fluorescente ou luminescente. Au mélange de la présente invention, est donc ajouté un substrat de synthèse de la thrombine et l'activité du système Protéine C - Protéine S est déduite de la mesure de l'activité amidolytique de la thrombine sur le substrat de synthèse. Comme substrat de synthèse dans le procédé selon l'invention, on peut utiliser un substrat chromogène choisi par exemple parmi les substrats suivants:

20. Tos-Gly-Pro-Arg-pNA.AcOH ( Chromozym TH, Marque déposée, PENTAPHARM ),  
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl ( S-2238, Marque déposée, KABI ),  
H-D-Phe-Pro-Arg-ANBA-isopropylamide ( BCP 100, Marque déposée, BEHRINGWERKE ),  
H-D-CHG-Abu-Arg-pNA. 2AcOH ( CBS 34-47, Marque déposée, PENTAPHARM ),  
25. H-D-HHT-Ala-Arg-pNA. 2AcOH ( Spectrozyme TH, Marque déposée, PENTAPHARM ),  
H-D-CHG-Ala-Arg-pNA. 2AcOH ( Th-1, Marque déposée, PENTAPHARM ),  
D-CHA-Abu-Arg-pNA. 2AcOH ( Berichrom, Marque déposée, PENTAPHARM ),  
H-D-HHT-Abut-Arg-pNA. 2AcOH,  
H-D-CHA-NVal-Arg-pNA. 2AcOH,  
30. dans lesquels Tos représente un groupement protecteur paratoluènesulfonyle, pNA signifie un groupement chromogène para-nitroaniline, D désigne un isomère optique dextogyre, ANBA correspond à l'acide 5-amino-2-nitro benzoïque, CHG représente un groupement cyclohexylglycyle, HHT signifie un groupement hexahydrotyrosile, CHA correspond à un groupement cyclohexylalanile, Abu et Abut signifient un motif dérivé d'acide  $\alpha$ -aminobutyrique, Pip représente un groupement piperazinyle, AcOH signifie l'acide acétique; ou

35.

un substrat fluorogène tel que:

Cbz-Gly-Pro-Arg- $\beta$ NA,

H-D-Phe-Pro-Arg-AIA,

5 Boc-Val-Pro-Arg-MCA, dans lesquels Cbz représente un groupement protecteur carbobenzyl oxy, Boc représente un groupement protecteur butyloxycarbonyle,  $\beta$ NA signifie  $\beta$ -naphtylamine, AIA représente l'acide 5 amino isophthalique, MCA représente la 7-amino-4-méthylcoumarine et D a la même signification que précédemment; ou

un substrat luminescent tel que:

10 Cbz-Phe-Pro-Arg-IL,

Ala-Phe-Pro-Arg-IL,

dans lesquels Cbz a la même signification que précédemment, IL est un groupement isoluminolamide .

15 Selon un mode de réalisation préférentiel de l'invention, pour préparer le mélange de l'étape a), on ajoute de façon séquentielle :

i) l'échantillon plasmatique ;

ii) la quantité prédéterminée de thrombomoduline ;

20 iii) les facteurs activés de la coagulation et/ou les activateurs des facteurs de la coagulation, pour la formation de thrombine endogène.

25 Le procédé peut être exécuté à pH neutre ou légèrement alcalin. De préférence la valeur du pH est comprise entre 7 et 8. Comme tampon pour ajuster le pH, on peut utiliser tout tampon physiologiquement compatible qui soit efficace dans cette gamme de pH, tel par exemple un tampon Tris/HCl.

30 L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description détaillée qui va suivre, faite en référence à la figure annexée, qui représente une courbe d'étalonnage pour la détermination de l'activité de la protéine C construite à l'aide d'un mélange de plasma normal dilué dans un plasma exempt de protéine C. En abscisse est représentée l'activité en protéine C, donnée en pourcentage par rapport à l'activité de la protéine C dans un plasma normal. En ordonnée est représenté le rapport de la quantité de thrombine formée sans thrombomoduline ( $A_0$ ), sur la quantité de thrombine formée en présence de thrombomoduline( $A_{TM}$ ), ce rapport ( $A_0/A_{TM}$ ) étant déterminé par l'absorbance à 405 nm.

5 Exemple 1 : Préparation de plasma exempt de Protéine C.

Un gel est préparé par couplage sur gel de sépharose d'un anticorps monoclonal de souris anti-Protéine C purifié , par exemple gel CNBr-sépharose activée CL4B commercialisé par la société PHARMACIA (Sépharose marque déposée), selon les indications du fabricant, à une concentration en immunoglobulines de 3mg/ml de gel. Un plasma dépourvu en Protéine C est fabriqué par élution d'un plasma normal sur le gel précité et immunocapture de la Protéine C par l'anticorps monoclonal anti-Protéine C.

10

15 Exemple 2 : Traitement de la thrombomoduline.

De préférence, la thrombomoduline utilisée est dépourvue des fragments polysaccharidiques responsables de son activité antithrombine et susceptibles d'interférer avec la quantité totale de thrombine formée.

15

Une thrombomoduline de lapin, commercialisée par la société AMERICAN DIAGNOSTICA, en solution à 12 U/ml, est digérée pendant 14 à 16 heures à 37°C par la chondroïtinase de la société SIGMA (0,1 U/ml), dans un tampon Tris (Tris marque de commerce) à pH 7,8.

20

Le contrôle de l'efficacité de la digestion est effectué par un système thrombine-thrombomoduline-antithrombine III purifié par mesure de la constante de vitesse d'inhibition de la thrombine (10nM) par de l'antithrombine III (1μM) en présence de thrombomoduline traitée.

25

25 Exemple 3 : Mesure de la quantité de thrombine formée.

Un plasma, de préférence défibriné par une protéine de venin de serpent telle que la reptilase STH 50 STAGO (un volume de reptilase pour 50 volumes de plasma) est additionné de thrombomoduline, telle que préparée dans l'exemple 2 à 12U/ml (un volume de thrombomoduline pour 10 volumes de plasma) et préchauffé jusqu'à 37°C pendant environ 5 minutes pour équilibrer la température. Un activateur de la coagulation composé de thromboplastine (Thrombomat, nom commercial BIOMERIEUX) dilué dans du tampon Tris 0,05M, pH 7,35 contenant du chlorure de calcium (0,017 M) est ajouté à raison de 0,36 volume d'activateur pour 0,64 volume de plasma (dilution finale : 1/160).

30

35 Le mélange ainsi obtenu est soumis à incubation pendant 5 minutes à 37°C, puis un aliquote de 10μl du mélange incubé est ajouté à une solution de

0,490 ml de S 2238 (substrat chromogène de la thrombine, de formule H-D-Phe-Pip-Arg-pNA commercialisé par KABI) à une concentration de 0,2 mM dans un tampon : Tris 0,05 M, NaCl 0,1 M, PEG 6000 (polyéthylène glycol) 1%, EDTA 0,02M (sel d'acide éthylènediaminetetraacétique), pH 7,9. Après deux minutes, l'arrêt de la réaction est réalisé avec de l'acide acétique concentré (0,3 ml) et l'absorbance est mesurée sur un spectrophotomètre à 405 nm à 37°C.

Exemple 4 : mesure de la thrombine formée sans addition de 10 thrombomoduline.

Le protocole expérimental est identique à celui décrit dans l'exemple précédent, sauf que l'addition de thrombomoduline est remplacée par l'addition d'un tampon Tris 0,05 M, pH 7,35 (un volume pour 10 volumes de plasma).

15

Exemple 5 : Détermination de l'activité Protéine C par photométrie.

20

a) - Une gamme d'étalonnage a été préparée à partir de plasma normal et de dilutions successives de plasma normal dans un plasma dépourvu en Protéine C, obtenu selon le protocole décrit dans l'exemple 2. Les résultats tels que représentés dans le tableau I ci-après sont donnés en pourcentage d'activité de la Protéine C par rapport à l'activité du plasma normal. Plasma normal et plasmas dilués sont mesurés pour la quantité de thrombine formée après 5 minutes en présence ou en l'absence de thrombomoduline, comme décrit respectivement dans les exemples 3 et 4. Le rapport  $A_0/A_{TM}$  correspond à la moyenne de 10 essais déterminée pour chaque concentration en Protéine C.  $A_0$  représente l'absorbance à 405 nm proportionnelle à la quantité de thrombine formée, sans addition de thrombomoduline.  $A_{TM}$  correspond à l'absorbance à 405 nm proportionnelle à la quantité de thrombine formée en présence de thrombomoduline. Les résultats sont 25 présentés dans le tableau I ci-après.

20

30

TABLEAU I

	Activité	Ratio $A_0/A_{TM}$	Ecart-Type
		(moyenne de 10 essais)	
5	0	1,17	0,046
	25	1,98	0,10
	50	2,46	0,12
	75	2,81	0,15
10	100	3,15	0,16

Comme cela ressort du tableau ci-dessus, une diminution de l'activité de la Protéine C dans le mélange se traduit par une diminution du rapport  $A_0/A_{TM}$ .

15 15 A partir des résultats ci-dessus a été construite la courbe d'étalonnage représentée à la figure annexée.

20 b) - Via la courbe d'étalonnage précédemment établie, l'activité de la Protéine C dans différents échantillons de plasma peut être déterminée. On a ainsi testé 4 sujets d'une même famille, parmi lesquels 3 sujets sont connus pour présenter des déficits en Protéine C, le 4ème sujet étant normal. Les résultats sont présentés dans le tableau II ci-après :

TABLEAU II

	Ratio $A_0/A_{TM}$	Activité	Concentration en
		(% par rapport à l'activité d'un plasma normal)	Protéine C (%) (par méthode immunologique)
25			
30			
	Sujet n°1	3,07	90
	Sujet n°2	2,38	49
	Sujet n°3	1,98	35
35	Sujet n°4	2,21	38

- 15 -

Comme cela ressort du tableau ci-dessus, les résultats obtenus confirment qu'un sujet, le sujet n°1, est normal alors que les trois autres présentent un déficit en Protéine C qui se manifeste par une diminution plus ou moins importante de l'activité de la Protéine C par rapport à celle d'un plasma normal, ainsi que par une concentration anormalement faible en Protéine C dans les plasmas.

10

15

20

✓

25

30

35

## REVENDICATIONS

1) - Procédé pour la détermination d'une activité protéine C et/ou protéine S dans un échantillon plasmatique comprenant les étapes consistant à :

5

a) préparer un mélange comprenant :

i) l'échantillon plasmatique ;

ii) une quantité prédéterminée de thrombomoduline ;

iii) au moins un facteur activé de la coagulation et/ou au moins un activateur des facteurs de la coagulation pour permettre la formation de thrombine endogène ;

10

b) incuber le mélange ainsi obtenu dans des conditions permettant l'activation de la protéine C et l'expression de la protéine C activée ;

15

c) ajouter au mélange un substrat de la thrombine ; et

20

d) quantifier l'activité protéine C et/ou protéine S dans l'échantillon par détermination d'une activité enzymatique de la thrombine sur l'édit substrat.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le mélange est incubé 3 à 6 minutes, avantageusement 5 minutes, à 37°C.

25

3) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la thrombomoduline est une thrombomoduline humaine ou animale, native ou recombinante, modifiée ou non modifiée ou leurs mélanges.

30

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la thrombomoduline est sous forme soluble.

5) Procédé selon les revendications 3 et 4, caractérisé en ce que la thrombomoduline est modifiée par une enzyme, telle que la chondroïtinase, trypsine, élastase ou analogues.

6) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdits facteurs activés de la coagulation comprennent les facteurs XII et/ou X activés.

5 7) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que lesdits activateurs sont choisis parmi les activateurs du facteur VII et/ou du facteur XIII et/ou du facteur X.

10 8) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit substrat est le fibrinogène.

9) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que ledit substrat est un substrat chromogène tel que Tos-Gly-Pro-Arg-pNA.AcOH ; H-D-Phe-Pip-Arg-pNA.2HCl ;

15 H-D-Phe-Pro-Arg-ANBA-isopropylamide ; H-D-CHG-Abu-Arg-pNA.2AcOH ;  
H-D-HHT-Ala-Arg-pNA.2AcOH ; H-D-CHG-Ala-Arg-pNA.2AcOH ;  
D-CHA-Abu-Arg-pNA.2AcOH ; H-D-CHA-NVal-Arg-pNA.2AcOH ;  
H-D-HHT-Abut-Arg-pNA-2AcOH

20 dans lesquels Tos représente un groupement protecteur paratoluènesulfonyle, pNA signifie un groupement chromogène para-nitroaniline, D désigne un isomère optique dextrogyre, ANBA correspond à l'acide 5-amino-2-nitro benzoïque, CHG représente un groupement cyclohexylglycyle, HHT signifie un groupement hexahydrotyrosile, CHA correspond à un groupement cyclohexylalanile, Abu et Abut signifient un motif dérivé d'acide  $\alpha$ -aminobutyrique, Pip représente un groupement piperazinyle, AcOH signifie l'acide acétique; ou

25 un substrat fluorogène tel que:

Cbz-Gly-Pro-Arg- $\beta$ NA,  
H-D-Phe-Pro-Arg-AIA,  
30 Boc-Val-Pro-Arg-MCA, dans lesquels Cbz représente un groupement protecteur carbobenzylxy, Boc représente un groupement protecteur butyloxycarbonyle,  $\beta$ NA signifie  $\beta$ -naphtylamine, AIA représente l'acide 5 amino isophthalique, MCA représente la 7-amino-4-méthylcoumarine et D a la même signification que précédemment; ou

35 un substrat luminescent tel que:

Cbz-Phe-Pro-Arg-IL,  
Ala-Phe-Pro-Arg-IL,

- 18 -

dans lesquels Cbz a la même signification que précédemment et IL est un groupement isoluminolamide .

5 10) Procédé selon l'une quelconque des revendication précédentes, caractérisé en ce que pour préparer le mélange on ajoute de façon séquentielle :

10 i) l'échantillon plasmatique ;  
ii) la quantité prédéterminée de thrombomoduline et;

iii) les facteurs activés de la coagulation et/ou les activateurs des facteurs de la coagulation.

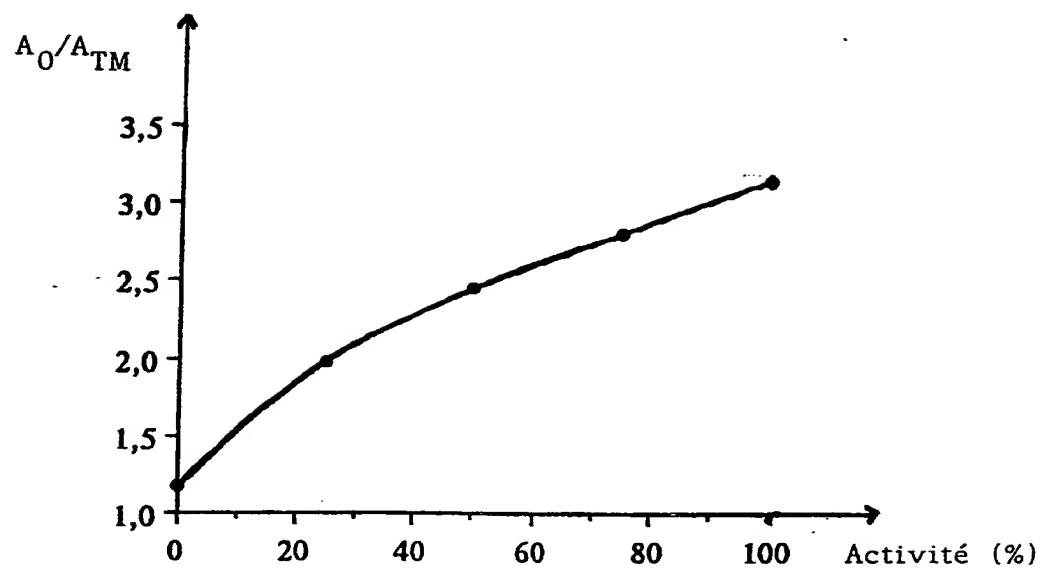
15

20

25

30

35

FIGURE UNIQUE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

## RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FR 9204184  
FA 469361

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendications concernées de la demande examinée	DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Y	EP-A-0 236 985 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) * le document en entier *	1				
A						
D	& US-A-5 001 069 ---	6-10				
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 13, no. 171 (C-588)24 Avril 1989 & JP-A-64 002 600 ( NIPPON ZOKI PHARMACEUT CO LTD ) 6 Janvier 1989 * abrégé *	1				
A						
A	DE-A-3 536 903 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) * le document en entier *	1,6-10				
D	& AU-B-569 433 ---					
A	WO-A-9 203 149 (BERLEX LABORATORIES INC) * page 2, ligne 1 - page 4, ligne 34 * * page 7, ligne 31 - page 8, ligne 22 *	1,3-8				
A	WO-A-9 102 812 (MICHIGAN STATE UNIVERSITY) * page 5, ligne 6 - page 6, ligne 12 *	1,3,4		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)		
A	FR-A-2 315 695 (PENTAPHARM AG) * le document en entier *	1,9		C12Q G01N		
A	US-A-4 336 186 (R.J.GARGIULO ET AL.) * le document en entier *	1,9				
	-----					
2						
Date d'achèvement de la recherche			Examinateur			
16 NOVEMBRE 1992			DE KOK A.J.			
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES						
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire						
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant						